中华蜜蜂 Malvolio 基因 *Acmvl* 的克隆及组织表达分析

孟　娇[1,#]，马卫华[2,#]，赵慧婷[3]，邵有全[2]，田嵩浩[4]，杨珊珊[1]，王树杰[1]，杜亚丽[1]，潘建芳[1]，姜玉锁[1,*]

（1. 山西农业大学动物科技学院，山西太谷 030801；2. 山西农业科学院园艺研究所，太原 030031；3. 山西农业大学生命科学学院，山西太谷 030801；4. 山西医科大学汾阳医学院，山西汾阳 032200）

摘要：【目的】本研究克隆了中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Malvolio (Mvl)基因的 cDNA 序列,分析了其编码蛋白的结构特点,并探讨其 mRNA 在内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂各部位组织中的表达差异,以期为该基因的生物学功能研究提供参考。【方法】利用 RT-PCR 技术从中华蜜蜂内勤蜂头部组织中扩增和克隆获得 *Acmvl* 的全长序列,并采用多种生物信息学软件分析 Acmvl 蛋白的结构特征;采用 Real-time PCR 对中华蜜蜂 *Acmvl* 在内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂各组织中的表达特征进行分析。【结果】*Acmvl* 基因 cDNA 全长为 2 130 bp(GenBank 登录号:KP662686),编码 587 个氨基酸,预测该蛋白分子量为 65.86 kD,等电点为 6.03,无信号肽,存在 11 个跨膜结构域、9 个糖基化位点和 14 个潜在磷酸化位点;系统发育树分析结果显示,中华蜜蜂 Acmvl 与其他膜翅目昆虫 Malvolio 聚为一支,与小鼠 *Mus musculus* 和人 *Homo sapiens* Nramp 家族的 Nramp2 聚为另一大分支,且与小鼠、水稻 *Oryza sativa*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 Nramp 家族同源体在跨膜区、跨膜区带电残基及转运蛋白特征结构域上有很高的保守性,尤其是与 Nramp2。*Acmvl* 基因在中华蜜蜂各部位组织中均有表达,但高表达于内勤蜂的胸部及采蜜蜂和采粉蜂的腹部和足部,提示该基因表达的差异影响采集行为。【结论】*Acmvl* 属于 *Nramp* 基因家族,可能为 *Nramp2* 的同源基因,该基因影响采集行为可能与转运 Cu^{2+}, Mn^{2+} 和 Fe^{2+} (尤其是 Fe^{2+})有关。

关键词：中华蜜蜂；Malvolio；基因克隆；序列分析；组织表达模式

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)07-0721-10

Cloning and tissue expression profiling of Malvolio gene *Acmvl* in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

MENG Jiao[1,#], MA Wei-Hua[2,#], ZHAO Hui-Ting[3], SHAO You-Quan[2], TIAN Song-Hao[4], YANG Shan-Shan[1], WANG Shu-Jie[1], DU Ya-Li[1], PAN Jian-Fang[1], JIANG Yu-Suo[1,*] (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; 3. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 4. Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clone the cDNA sequence of Malvolio (Mvl) gene in *Apis cerana cerana*, to analyze the structure of its coding protein, and to explore its expression profiles of mRNA in different tissues of nurse, nectar forager and pollen forager. This may provide a fundamental evidence for the future study of the physiological function of this gene.【Methods】The cDNA sequence of *Acmvl* was cloned from the brain of *A. c. cerana* nurse by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). A quantitative analysis of its expression level in different tissues (antenna, head, thorax, abdomen and leg) of the nurse, nectar forager and pollen forager was conducted using real-time PCR.

基金项目：国家公益性行业(农业)科研专项(201203080)；国家自然科学基金项目(31272513)

作者简介：孟娇，女，1988 年 9 月生，山西五台人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂分子生物学，E-mail：jiao1778@163.com；马卫华，女，1977 年 4 月生，山西翼城人，副研究员，研究方向为蜜蜂授粉生物学，E-mail：mawh1997@163.com

[#]并列第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail：jiangys-001@163.com

收稿日期 Received：2015-01-05；接受日期 Accepted：2015-05-28

【Results】The full-length cDNA sequence of *Acmvl* of *A. c. cerana* is 2 130 bp (GenBank accession no. KP662686), encoding 578 amino acids with the predicted MW and pI of 65.86 kD and 6.03, respectively. The encoded protein has no signal peptide but has 11 transmembrane domains, 9 predicted glycosylation sites and 14 potential phosphorylation sites. Phylogenetic analysis indicated that Acmvl of *A. c. cerana* and Malvolio proteins of other Hymenoptera insects gather in the same clade, and Acmvl of *A. c. cerana* and Nramp2 proteins of Nramp family from *Mus musculus* and *Homo sapiens* gather in another clade. Acmvl of *A. c.* cerana has an extensive similarity to Nramp proteins of *Mus musculus*, *Oryza sativa*, *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae* in transmembrane domain (TM), charged residues of TM and transport motif, especially with Nramp2 proteins. The *Acmvl* transcript was clearly detected in different tissues of the worker, and was expressed significantly higher in thorax of nurse, abdomen and legs of nectar and pollen forager, suggesting that the expression of *Acmvl* gene has an effect on foraging behavior of bees.【Conclusion】As a member of the family of *Nramp*, *Acmvl* gene may be homologous with *Nramp*2, and it affects foraging behavior in part because of its involvement in transportation of Fe^{2+} Cu^{2+} and Mn^{2+}, especially Fe^{2+}.

Key words: *Apis cerana cerana*; Malvolio (Mvl); gene cloning; sequence analysis; tissue expression profile

蜜蜂作为一种典型的社会性昆虫,其群体内部具有明确而细致的劳动分工(Robinson, 1992)。其中,蜂王和雄蜂共同负责繁殖,而工蜂根据其生理日龄承担巢内外所有工作,1 - 3 周龄,作为内勤蜂,在巢内饲喂幼虫、保温孵卵及清理巢房等;3 周龄后,成熟为采集蜂,开始出巢采集花粉、花蜜、树胶和水。工蜂由内勤蜂到采集蜂的行为转变受巢内外环境、激素水平、脑部化学物质和结构、脑部基因表达等多种因素影响(Robinson, 2002)。已测得蜜蜂头部几千个基因的表达与这种转变有关,其中,*Foraging* (*For*)和 *Malvolio* (*Mvl*)被认为是最有可能影响蜜蜂采集行为的基因(Whitfield *et al*., 2003)。

Malvolio (Mvl)最初被发现是由于其影响黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的蔗糖反应,其基因突变后,果蝇蔗糖反应明显降低;之后,发现 Malvolio 属于天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance associated macrophage protein, Nramp)家族,可能通过转运 Mn^{2+}, Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 影响了果蝇的味觉反应,但该基因在味觉反应中的具体功能还不清楚(Orgad *et al*., 1998; Southon *et al*., 2008)。而蔗糖作为蜜蜂采集行为的一种重要刺激,蜜蜂对蔗糖反应的差别影响其采集行为,包括影响工蜂起始采集的日龄和采蜜/粉的偏好性(Page *et al*., 1998; Pankiw and Page, 1999)。Ben-Shahar 等(2004)在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中研究显示,*Ammvl*(*Malvolio*)可能编码一种 Mn^{2+} 转运蛋白,食物中添加 Mn^{2+} 会引起年幼工蜂提早出巢采集。另一个与果蝇取食相关的基因 *Foraging*(*Amfor*)已被发现参与了工蜂由内勤蜂到采集蜂的转变(Ben-Shahar, 2002a, 2002b)。因此,*Malvolio* 作为与果蝇取食相关的基因是否通过影响蜜蜂的蔗糖反应来影响其采集行为值得探究。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国的原产蜂种,具有嗅觉灵敏、采集勤奋、善采零星蜜粉源、抗螨抗病力强、耐热耐寒性高等西方蜜蜂 *A. mellifera* 不可比拟的优点,长期以来对形成和维护我国独特的植被体系起到了非常重要的作用(杨冠煌, 2005)。目前,有关中华蜜蜂 Mvl 基因的研究尚未见报道。因此,本研究对中华蜜蜂的 Mvl 基因 *Acmvl* 进行克隆及序列分析,并对该基因在内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂各组织(触角、头、胸、腹和足)的表达量进行了分析,以期为探究中华蜜蜂采集行为机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试虫

取样蜂群来自山西农业大学动物科技学院实验蜂场饲养的中华蜜蜂。选取一群健康无病、群势 6 足框、无自然分蜂的正常蜂群作为试验蜂群。

先从该蜂群中取出 1 个老熟的封盖子脾,置于 34.5℃ 的恒温恒湿箱中,待其羽化出房后,用无毒、无味的油漆在其胸背部标记工蜂 200 头后,放回原蜂群中。于标记日起的第 7 日上午 9:00 - 11:00 点蜜蜂出巢采集高峰期,在巢门口用镊子夹取足部携带花粉团(采粉蜂)和腹部膨大(采蜜蜂)的回巢蜜蜂各 100 头,之后,打开蜂箱取标记蜜蜂(内勤蜂) 100 头。将内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂样品在冰上分别按触角、头、胸(带翅)、腹和足 5 个部位取下,投入液氮速冻后,于 -80℃ 保存备用。

1.2　主要试剂与仪器

RNAiso™ Plus，DNA Marker（DL1000），Taq DNA polymerase，PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒及 SYBR® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ荧光定量试剂盒均购自 TaKaRa 公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 OMEGA 公司；pGM-T 连接试剂盒，DH5α 感受态细胞，X-gal，IPTG，三氯甲烷、DEPC 等常规试剂均购自天根生化科技有限公司。

5810R 高速冷冻离心机（Eppendorf），7500 FAST 型荧光定量 PCR 仪（ABI），AB-9902 型触摸式 PCR 仪（AB），Universal Hood Ⅱ 核酸蛋白成像仪（BIO-RAD），ND-1000 核酸蛋白测定仪（Nanodrop）。

1.3　RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

从 -80℃冰箱内取出已分离好的分别由 100 头内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂各自不同部位组织（触角、头、胸、腹和足）组成的混合样品，经液氮研磨后，按照 Trizol 试剂盒（TaKaRa 公司）说明书提取各组织总 RNA，测定浓度和纯度后，再根据 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒（TaKaRa 公司）反转录为 cDNA 模板。反转录产物于 4℃保存备用。其中，内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂各组织的 cDNA 模板会用于荧光定量 PCR 反应；而内勤蜂头部的 cDNA 模板同时也用于 RT-PCR 反应。

1.4　引物设计

根据 GenBank 中已公布的西方蜜蜂 *Ammvl* 基因的 mRNA 序列（登录号：XM_623943），采用 Primer3 Plus 在线软件设计引物 A，B，C 和 D，用于扩增中华蜜蜂 *Acmvl* 基因的 CDS 区序列。设计荧光定量引物 E，内参基因选用 18S rRNA。引物交由北京六合华大基因公司合成。引物序列见表 1。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences
Acmvl 基因 CDS 区的克隆 Cloning of coding sequence for *Acmvl* gene	A	F：TTGCCTTGTCGCAGCGCATT R：GCCAAATGCAAACCTGTTACCACACC
	B	F：TGGGCCTTTACAGGTCCTGGATT R：TGCTGCACCAAACGCACAACC
	C	F：GCTCCACCTGAAAGTGAAGTA R：CTGCCCAGTGATGCGGTAAAT
	D	F：AGGACAATGTGCAATGGAAGGAT R：AAATGTAGCAGTACGAATCACGA
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	E	F：TGCATACGTTCCTGTCATTGTGG R：AGGTGGCATATTTCTCGGTTGTG
	18S rRNA	F：CCCGTAATCGGAATGAGTACACTTT R：ACGCTATTGGAGCTGGAATTACC

1.5　PCR 扩增、克隆和测序

PCR 扩增反应：总体系为 20 μL，含内勤蜂头部 cDNA 模板 1.5 μL，dNTPs 1.6 μL，Buffer 2 μL，LA-Taq DNA polymerase 0.3 μL，ddH_2O 13.8 μL。反应条件为：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，52～62℃（不同引物）退火 1 min，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 8 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

根据胶回收试剂盒进行切胶回收，将回收产物与 pGM-T 载体连接，转化到 DH5α 感受态细胞后，经蓝白斑筛选鉴定，挑取白色单克隆菌斑培养，菌液经 PCR 鉴定后，对阳性克隆产物进行双向测序。

Acmvl 5′-RACE 由自行设计引物扩增获得，3′-RACE 由大连宝生物公司完成。

1.6　荧光定量 PCR 反应

目标基因和内参基因 18S rRNA 引物见表 1。将反转录合成的内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂各组织 cDNA 模板稀释 20 倍后，根据 TaKaRa 的 SYBR *Premix Ex Taq*™ Ⅱ试剂盒进行实时荧光定量 PCR。反应体系总体积为 20 μL，含 cDNA 模板 2 μL，SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（2 ×）10 μL，ROX Reference Dye II（50 ×）0.4 μL，上、下游引物各 0.8 μL，ddH_2O 6 μL。反应条件为：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，63℃退火及延伸 34 s，40 个循环。每个组织样本重复测定 3 次。

1.7　序列分析

将测序所得序列在 NCBI 中用 Blast 进行同源序列比对，采用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接。采用 Protparam（http://web.expasy.org/protparam/）、SignalP 4.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）、NetOGlyc 4.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/）、NetNGlyc 1.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）和 NetPhos 2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）分别对其蛋白质的理化性质、信号肽、O-糖基化位点、N-糖基化位点和磷酸化位点进行了预测，采用 PSIPRED（http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/）在线软件对该蛋白的跨膜区及二级结构进行了预测分析。

采用 Mega 5.0 对部分膜翅目昆虫、以及哺乳动物中与中华蜜蜂 Acmvl 相似性较高的氨基酸序列进行比对，并通过邻接法（neighbor-joining，NJ）构建了系统发育树；将 Acmvl 氨基酸序列与 Cellier 等（1995）研究的小鼠 *Mus musculus*、黑腹果蝇 *D. melanogaster*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和水稻 *Oryza sativa* Nramp 蛋白家族的同源序列进行比对分析。

1.8 数据统计与分析

荧光定量 PCR 中,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析。运用 SPSS 17.0 软件中的单因素 ANOVA 方法进行方差分析,并选用新复极差法进行多重比较。

2 结果

2.1 中华蜜蜂 *Acmvl* 的 cDNA 序列测定

利用自行设计的 4 对引物(A,B,C 和 D)分别对中华蜜蜂 *Acmvl* 基因进行 PCR 扩增、克隆(图 1)和测序,采用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接,并结合 RACE 序列,得到长度为 2 130 bp 的中华蜜蜂 *Acmvl* cDNA 全长序列(GenBank 登录号:KP662686)(图 2)。将该序列与 NCBI 中西方蜜蜂(GenBank 登录号:XM_623943)该基因序列进行相似性比对,其核苷酸序列一致性为 88%(图 3),确定克隆得到的为中华蜜蜂 *Acmvl* 基因的 cDNA 序列。

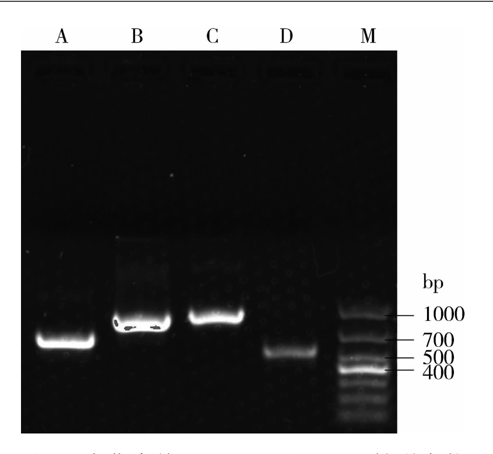


图 1 中华蜜蜂 *Acmvl* 基因 CDS 区扩增产物

Fig. 1 PCR products of CDS sequence of *Acmvl* gene from *Apis cerana cerana*

M: DL1000 Marker. A, B, C, D: 分别为相应引物 A, B, C 和 D 的扩增片段 Amplified fragments with the corresponding primers A, B, C and D.

2.2 中华蜜蜂 *Acmvl* 编码蛋白分析

2.2.1 基本理化性质:序列分析表明,中华蜜蜂 *Acmvl*

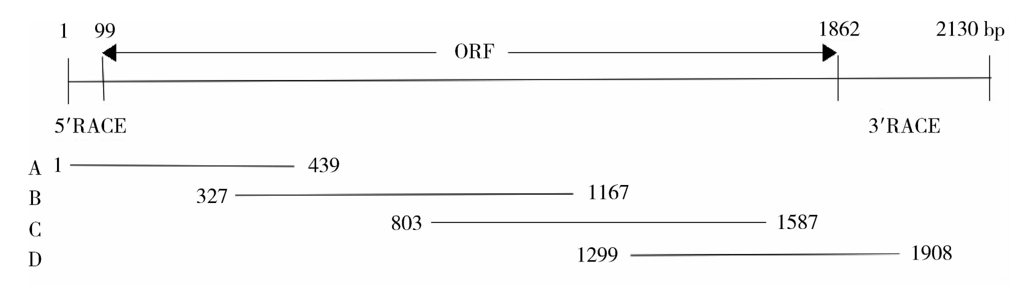


图 2 中华蜜蜂 *Acmvl* 基因的扩增产物拼接示意图

Fig. 2 Splicing sketch of amplification products of *Acmvl* gene from *Apis cerana cerana*

A, B, C, D: 分别代表相应引物 A, B, C 和 D 扩增片段在 *Acmvl* cDNA 中的位置 Location of the amplified fragment with the corresponding primers A, B, C and D in *Acmvl* cDNA.

开放阅读框(ORF)为 1 746 bp,编码 587 个氨基酸(图 4),分子量为 65.86 kD,理论等电点(pI)为 6.03,包含 20 种常见氨基酸,其中 Ile 含量最高(10.7%),其次为 Leu(10.6%),Cys 含量最低(1.0%),带负电氨基酸残基数(Asp + Glu)为 44,带正电氨基酸残基数(Arg + Lys)为 39。该蛋白的不稳定系数为 34.35,脂溶指数为 108.65,总平均亲水性为 0.370,说明 Acmvl 为稳定的膜蛋白。

2.2.2 中华蜜蜂 Acmvl 的信号肽、跨膜结构、糖基化位点、磷酸化位点及二级结构:信号肽及跨膜结构预测显示,该蛋白无信号肽,存在 11 个跨膜结构域(图 5)。糖基化位点预测结果表明,该蛋白 Ser^{13} 和 Thr^{16} 的 O 糖基潜力值分别为 0.515 和0.682,均高于阈值 0.5,即这两个位点为该蛋白的 O 糖基化位点;N 糖基化位点预测结果显示,该蛋白存在 7 个 N 糖基化位点($Asn^{43,174,321,335,347,432,580}$)。磷酸化位点预测结果显示,该蛋白存在 8 个丝氨酸($Ser^{9,13,35,119,283,462,532,553}$)和 6 个酪氨酸($Tyr^{37,81,223,242,320,564}$)潜在磷酸化位点。Acmvl 二级结构预测,α 螺旋(helix)、β 折叠股(strand)和环(loop)的比例分别是 58.43%,1.53% 和 40.03%(图 6)。

2.3 Acmvl 与其他物种氨基酸序列的相似性分析

将测序得到的 Acmvl 氨基酸序列在 NCBI 中利用 Blast 工具搜索后,发现中华蜜蜂 *A. c. cerana* 与西方蜜蜂 *A. mellifera*、大蜜蜂 *Apis dorsata*、小蜜蜂 *Apis florea*、熊蜂 *Bombus impatiens*、切叶蜂 *Megachile rotundata*、红火蚁 *Solenopsis invicta*、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、黑腹果蝇 *D. melanogaster*、小鼠 *M. musculus* 和人

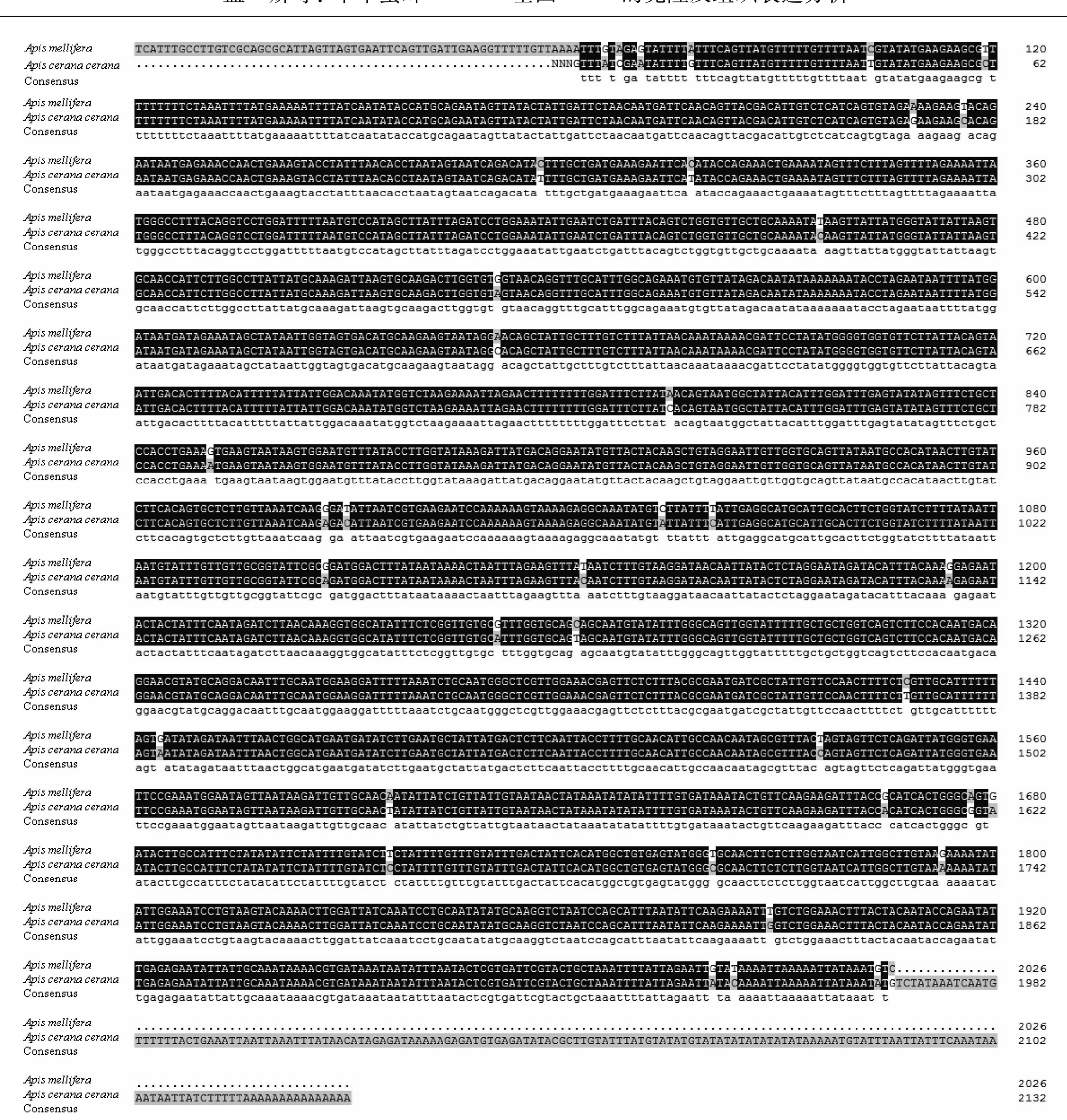


图 3　中华蜜蜂和西方蜜蜂的 *Malvolio* cDNA 序列比对

Fig. 3　Alignment of *Malvolio* cDNA sequences between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

黑色阴影表示一致的核苷酸位点；灰色阴影表示不一致的核苷酸位点；缺失位点由点号代替。Identical nucleotides are shaded in black, different nucleotides are shaded in grey, and gaps are indicated by dots.

Homo sapiens 的氨基酸序列一致性分别为：99%，99%，98%，89%，86%，77%，72%，68%，65%，64% 和 63%。采用 Mega5.0 对这 11 个物种的 Malvolio 构建系统发育树（图 7），显示中华蜜蜂先与西方蜜蜂聚为一个小分支，之后，与其他膜翅目昆虫 Malvolio 构成一个较大分支，此分支由蜜蜂科、切叶蜂科、蚁科和小蜂总科 4 个亚支构成；而与脊椎动物中的小鼠和人 Nramp2 聚为另一大分支。

选取有代表性的小鼠（Nramp1 和 Nramp2）、植物（Osnramp1）、酵母（Smf1 和 Smf2）和果蝇（Malvolio）的 Nramp 家族成员的氨基酸序列与 Acmvl 进行相似性比对分析（图 8），发现 Acmvl 与这 6 个 Nramp 家族同源体的序列一致性分别为 49%，54%，32%，23%，22% 和 53%。结构相似性具体表现为：(1) Nramp 家族普遍具有 10～12 个跨膜区（transmembrane domain，TM），且氨基和羧基末端都位于细胞内；(2) 二者在跨膜区及跨膜区带电残基上具有高度保留性，TM1，4，6 和 10 保守性最高，TM8，11 和 12 保守性最差，而 TM1，3，4，5 和 7 含有带负电的保守性残基，6 和 9 跨膜区包含带正电的保守性残基；(3) TM1－2，2－3，3－4 和 8－9 间的 loop 区也是高度保守的，且在 TM8－9 之间，Acmvl 与 Nramp1 具有完全相同的转运蛋白特征的结构域（transport motif）；(4) ACMVL 蛋白二级结构预测结果显示：在 TM7－8 之间，含有 1 个 N-糖基化的胞质外环状结构。

```
1     GTTTATCGAATATTTTGTTTCAGTTATGTTTTTGTTTTAATTGTATATGAAGAAGCGCTT

61    TTTTTTCTAAATTTTATGAAAAATTTTATCAATATACC[ATG]CAGAATAGTTATACTATTG
                                            M  Q  N  S  Y  T  I
121   ATTCTAACAATGATTCAACAGTTACGACATTGTCTCATCAGTGTAGAGAAGAAGCACAGA
      D  S  N  N  D  S  T  V  T  T  L  S  H  Q  C  R  E  E  A  Q
181   ATAATGAGAAACCAACTGAAAGTACCTATTTAACACCTAATAGTAATCAGACATATTTTG
      N  N  E  K  P  T  E  S  T  Y  L  T  P  N  S  N  Q  T  Y  F
241   CTGATGAAAGAATTCATATACCAGAAACTGAAAATAGTTTCTTTAGTTTTAGAAAATTAT
      A  D  E  R  I  H  I  P  E  T  E  N  S  F  F  S  F  R  K  L
301   GGGCCTTTACAGGTCCTGGATTTTTAATGTCCATAGCTTATTTAGATCCTGGAAATATTG
      W  A  F  T  G  P  G  F  L  M  S  I  A  Y  L  D  P  G  N  I
361   AATCTGATTTACAGTCTGGTGTTGCTGCAAAATACAAGTTATTATGGGTATTATTAAGTG
      E  S  D  L  Q  S  G  V  A  A  K  Y  K  L  L  W  V  L  L  S
421   CAACCATTCTTGGCCTTATTATGCAAAGATTAAGTGCAAGACTTGGTGTAGTAACAGGTT
      A  T  I  L  G  L  I  M  Q  R  L  S  A  R  L  G  V  V  T  G
481   TGCATTTGGCAGAAATGTGTTATAGACAATATAAAAAAATACCTAGAATAATTTTATGGA
      L  H  L  A  E  M  C  Y  R  Q  Y  K  K  I  P  R  I  I  L  W

541   TAATGATAGAAATAGCTATAATTGGTAGTGACATGCAAGAAGTAATAGGCACAGCTATTG
      I  M  I  E  I  A  I  I  G  S  D  M  Q  E  V  I  G  T  A  I
601   CTTTGTCTTTATTAACAAATAAAACGATTCCTATATGGGGTGGTGTTCTTATTACAGTAA
      A  L  S  L  L  T  N  K  T  I  P  I  W  G  G  V  L  I  T  V
661   TTGACACTTTTACATTTTTATTATTGGACAAATATGGTCTAAGAAAATTAGAACTTTTTT
      I  D  T  F  T  F  L  L  L  D  K  Y  G  L  R  K  L  E  L  F
721   TTGGATTTCTTATCACAGTAATGGCTATTACATTTGGATTTGAGTATATAGTTTCTGCTC
      F  G  F  L  I  T  V  M  A  I  T  F  G  F  E  Y  I  V  S  A
781   CACCTGAAAATGAAGTAATAAGTGGAATGTTTATACCTTGGTATAAAGATTATGACAGGA
      P  P  E  N  E  V  I  S  G  M  F  I  P  W  Y  K  D  Y  D  R
841   ATATGTTACTACAAGCTGTAGGAATTGTTGGTGCAGTTATAATGCCACATAACTTGTATC
      N  M  L  L  Q  A  V  G  I  V  G  A  V  I  M  P  H  N  L  Y
901   TTCACAGTGCTCTTGTTAAATCAAGAGACATTAATCGTGAAGAATCCAAAAAAGTAAAAG
      L  H  S  A  L  V  K  S  R  D  I  N  R  E  E  S  K  K  V  K
961   AGGCAAATATGTATTATTTCATTGAGGCATGCATTGCACTTCTGGTATCTTTTATAATTA
      E  A  N  M  Y  Y  F  I  E  A  C  I  A  L  L  V  S  F  I  I
1021  ATGTATTTGTTGTTGCGGTATTCGCAGATGGACTTTATAATAAAACTAATTTAGAAGTTT
      N  V  F  V  V  A  V  F  A  D  G  L  Y  N  K  T  N  L  E  V
1081  ACAATCTTTGTAAGGATAACAATTATACTCTAGGAATAGATACATTTACAAAAGAGAATA
      Y  N  L  C  K  D  N  N  Y  T  L  G  I  D  T  F  T  K  E  N

1141  CTACTATTTCAATAGATCTTAACAAAGGTGGCATATTTCTCGGTTGTGCATTTGGTGCAG
      T  T  I  S  I  D  L  N  K  G  G  I  F  L  G  C  A  F  G  A
1201  TAGCAATGTATATTTGGGCAGTTGGTATTTTTGCTGCTGGTCAGTCTTCCACAATGACAG
      V  A  M  Y  I  W  A  V  G  I  F  A  A  G  Q  S  S  T  M  T
1261  GAACGTATGCAGGACAATTTGCAATGGAAGGATTTTTAAATCTGCAATGGGCTCGTTGGA
      G  T  Y  A  G  Q  F  A  M  E  G  F  L  N  L  Q  W  A  R  W
1321  AACGAGTTCTCTTTACGCGAATGATCGCTATTGTTCCAACTTTTCTTGTTGCATTTTTTA
      K  R  V  L  F  T  R  M  I  A  I  V  P  T  F  L  V  A  F  F
1381  GTAATATAGATAATTTAACTGGCATGAATGATATCTTGAATGCTATTATGACTCTTCAAT
      S  N  I  D  N  L  T  G  M  N  D  I  L  N  A  I  M  T  L  Q
1441  TACCTTTTGCAACATTGCCAACAATAGCGTTTACCAGTAGTTCTCAGATTATGGGTGAAT
      L  P  F  A  T  L  P  T  I  A  F  T  S  S  S  Q  I  M  G  E
1501  TCCGAAATGGAATAGTTAATAAGATTGTTGCAACTATATTATCTGTTATTGTAATAACTA
      F  R  N  G  I  V  N  K  I  V  A  T  I  L  S  V  I  V  I  T
1561  TAAATATATATTTTGTGATAAATACTGTTCAAGAAGATTTACCACATCACTGGGCGGTAA
      I  N  I  Y  F  V  I  N  T  V  Q  E  D  L  P  H  H  W  A  V
1621  TACTTGCCATTTCTATATATTCTATTTTGTATCTCCTATTTTGTTTGTATTTGACTATTC
      I  L  A  I  S  I  Y  S  I  L  Y  L  L  F  C  L  Y  L  T  I
1681  ACATGGCTGTGAGTATGGGCGCAACTTCTCTTGGTAATCATTGGCTTGTAAAAAAATATA
      H  M  A  V  S  M  G  A  T  S  L  G  N  H  W  L  V  K  K  Y

1741  TTGGAAATCCTGTAAGTACAAAACTTGGATTATCAAATCCTGCAATATATGCAAGGTCTA
      I  G  N  P  V  S  T  K  L  G  L  S  N  P  A  I  Y  A  R  S
1801  ATCCAGCATTTAATATTCAAGAAAATTGGTCTGGAAACTTTACTACAATACCAGAATAT[T
      N  P  A  F  N  I  Q  E  N  W  S  G  N  F  T  T  I  P  E  Y
1861  GA]GAGAATATTATTGCAAATAAAACGTGATAAATAATATTTAATACTCGTGATTCGTACT
      *
1921  GCTAAATTTTATTAGAATTATACAAAATTAAAAATTATAAATATGTCTATAAATCAATGT

1981  TTTTTACTGAAATTAATTAAATTTATAACATAGAGATAAAAAGAGATGTGAGATATACGC

2041  TTGTATTTATGTATATGTATATATATATATATAAAAATGTATTTAATTATTTCAAATAAA

2101  ATAATTATCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 4 中华蜜蜂 *Acmvl* cDNA 核苷酸及其推导的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Acmvl* from *Apis cerana cerana*

起始密码子和终止密码子用方框标注。The start and stop codons are boxed.

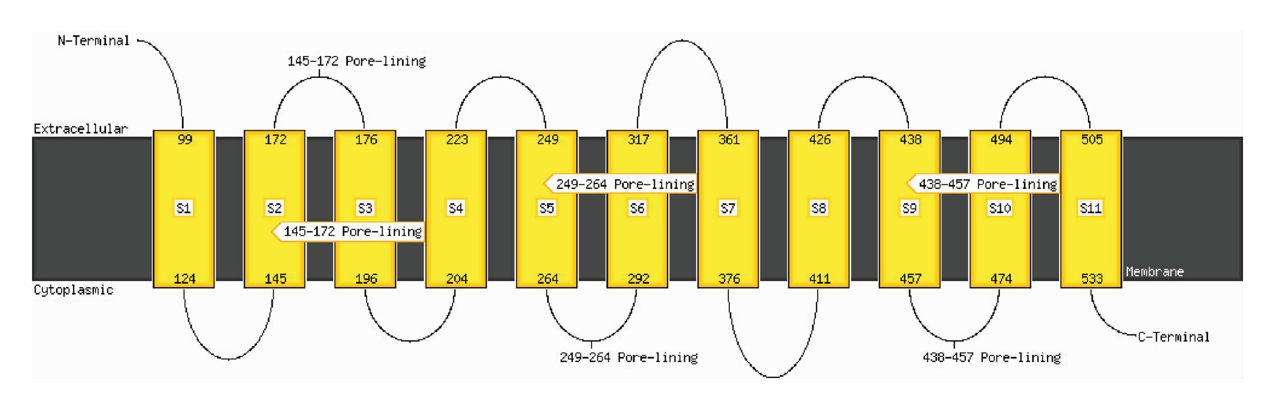


图 5 通过 PSIPRED 软件分析的中华蜜蜂 Acmvl 跨膜螺旋结构示意图

Fig. 5 Schematic model of Acmvl from *Apis cerana cerana* by PSIPRED

S1 – S11：不同的跨膜结构域 Different transmembrane domains.

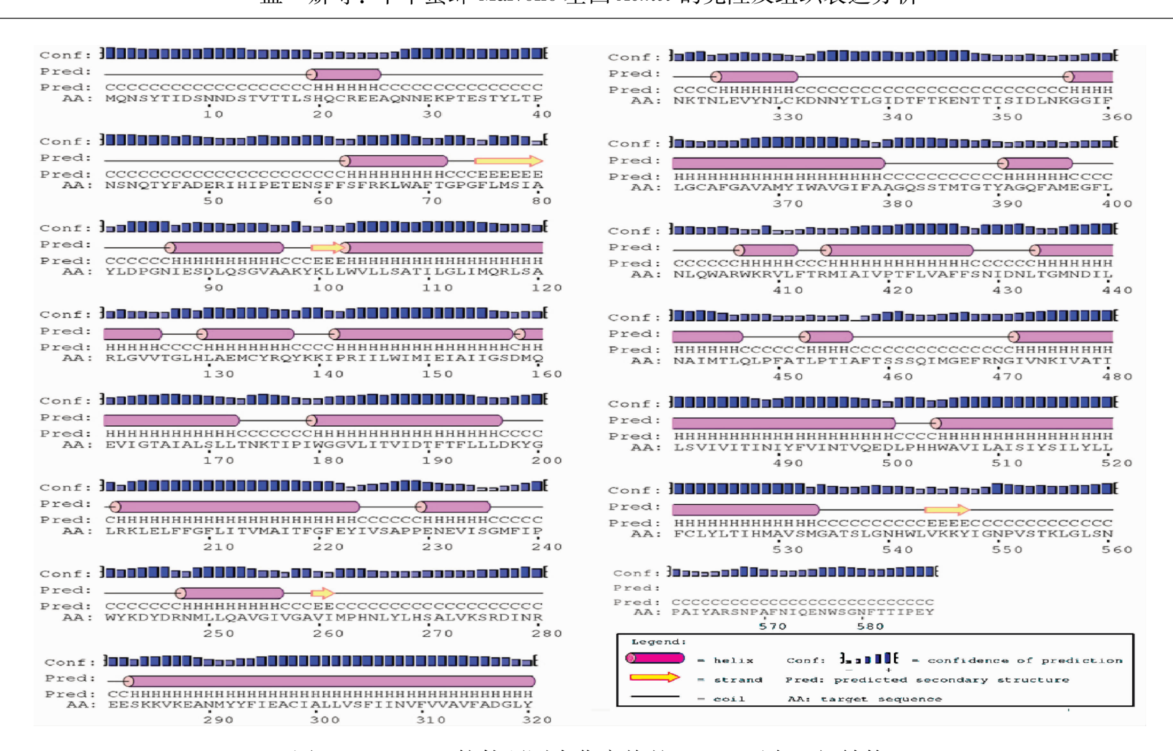


图 6　PSIPRED 软件预测中华蜜蜂的 Acmvl 蛋白二级结构

Fig. 6　Prediction of the secondary structure of Acmvl protein from *Apis cerana cerana* by PSIPRED

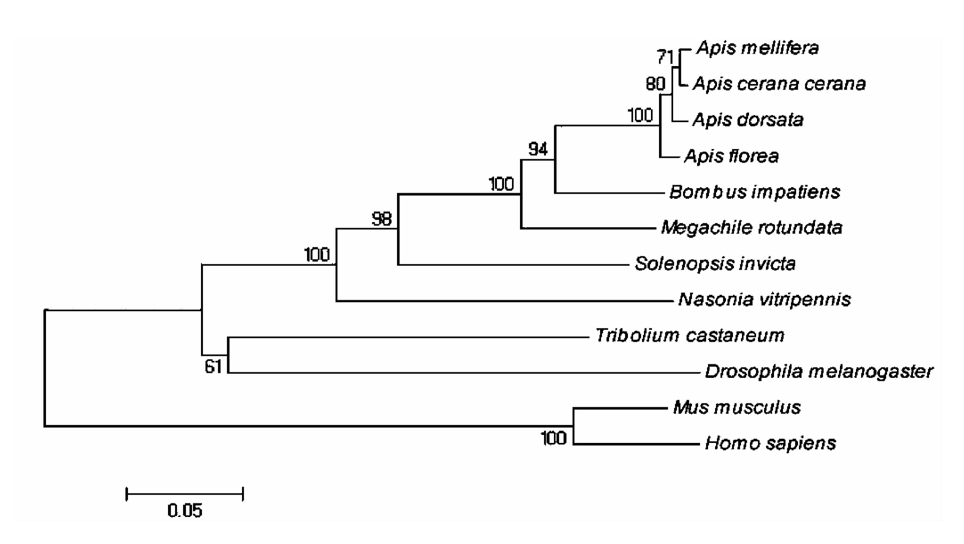


图 7　基于中华蜜蜂与其他物种 Malvolio 氨基酸序列所构建的系统发育树

Fig. 7　Phylogenetic tree of Malvolio from *Apis cerana cerana* and other species based on amino acid sequences

各物种 Malvolio 的 GenBank 登录号分别为 Origin of Malvolio proteins and their GenBank accession numbers：西方蜜蜂 *Apis mellifera*，XP_623946；大蜜蜂 *Apis dorsata*，XP_006616725；小蜜蜂 *Apis florea*，XP_003694454；熊蜂 *Bombus impatiens*，XP_003485198；切叶蜂 *Megachile rotundata*，XP_003708306；红火蚁 *Solenopsis invicta*，EFZ19575；丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*，XP_001600967；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*，XP_967521；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*，NP_524425；小鼠 *Mus musculus*，XP_006520639；人 *Homo sapiens*，XP_005268970. 系统发育树采用邻接法（Neighbor-Joining，NJ）进行了 1 000 次重复构建，树枝度代表遗传距离，进化树分支上的数值 Booststrap 代表 1 000 次循环检验时的置信度。Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining with 1 000 replications，branch length of tree represented the genetic distance，and bootstrap support values（%）based on 1 000 replicates were indicated.

2.4　中华蜜蜂 *Acmvl* mRNA 表达量分析

通过实时荧光定量 PCR 分析了 *Acmvl* 在中华蜜蜂内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂的不同部位组织（触角、头、胸、腹和足）mRNA 的表达差异，结果如图 9 所示。*Acmvl* 在内勤蜂及采集蜂的各组织均有表达。内勤蜂中，胸部表达量（7.471）最高，显著高于其他部位组织（$P<0.05$），其次为头部（3.691），再次之为足部（1.228）和腹部（1.126），但二者间差异不显

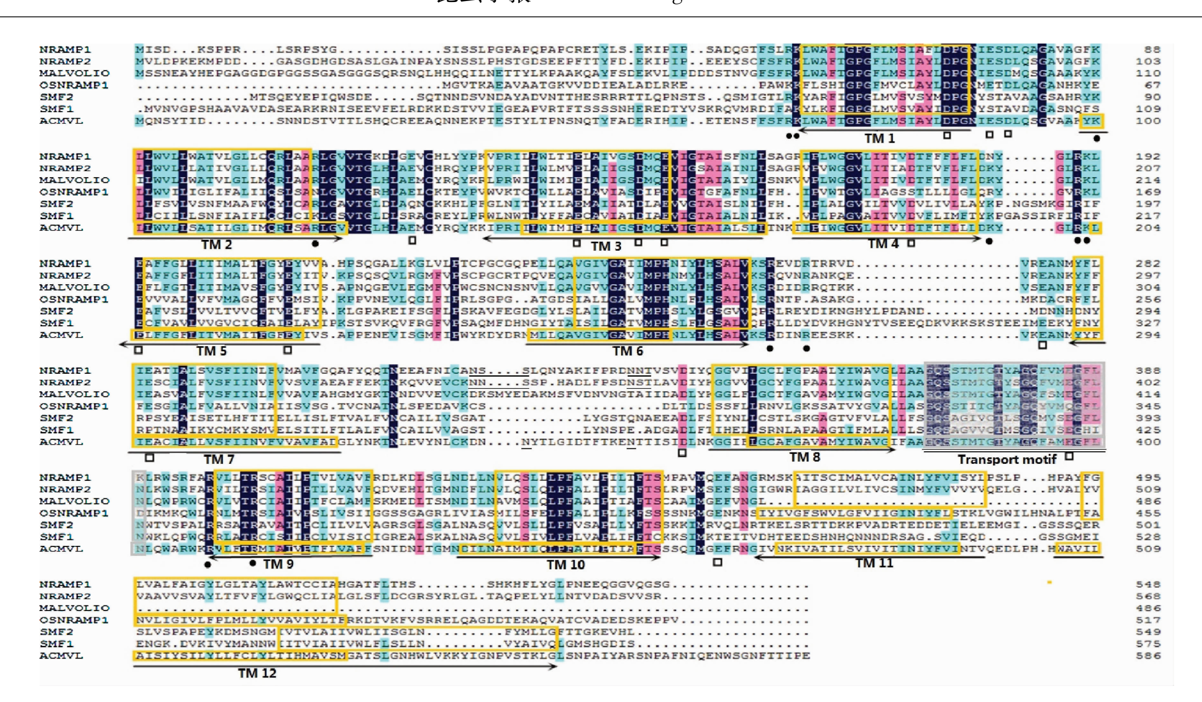


图 8 Acmvl 与 Nramp 家族 6 个同源体的氨基酸序列比较分析

Fig. 8 Amino acid sequence alignment between Acmvl and six homologues of *Nramp* family

图中各序列的 GenBank 登录号为 Nramp1 (L13732), Nramp2 (L33415), Osnramp1 (L41217), Smf1 (P38925), Smf2 (P38778) 和 Malvolio (U23948)。黑色阴影表示保守性极高的残基位点;灰色阴影表示保守性较高的残基位点;缺失位点由点代替。方框内为跨膜区序列,箭头方向表示膜内,下划线表示糖基化位点,灰色阴影区表示转运蛋白结构域,圆点表示该列有至少 4/7 的残基带正电荷,方框表示该列有至少 4/7 的残基带负电荷。The GenBank accession numbers of sequences in the figure are Nramp1 (L13732), Nramp2 (L33415), Osnramp1 (L41217), Smf1 (P38925), Smf2 (P38778) and Malvolio (U23948). Identical amino acids are shaded in black, amino acids with higher identity are shaded in grey; and gaps are indicated by dots. The putative transmembrane (TM) regions are shown in yellow box by a line down the sequences which includes the orientation relative to the membrane (arrowhead, In). Putative glycosylation sites are underlined and the putative transport-motif region is in grey. Charges conserved in at least four of the seven sequences are marked in solid dot (+) or frame (−).

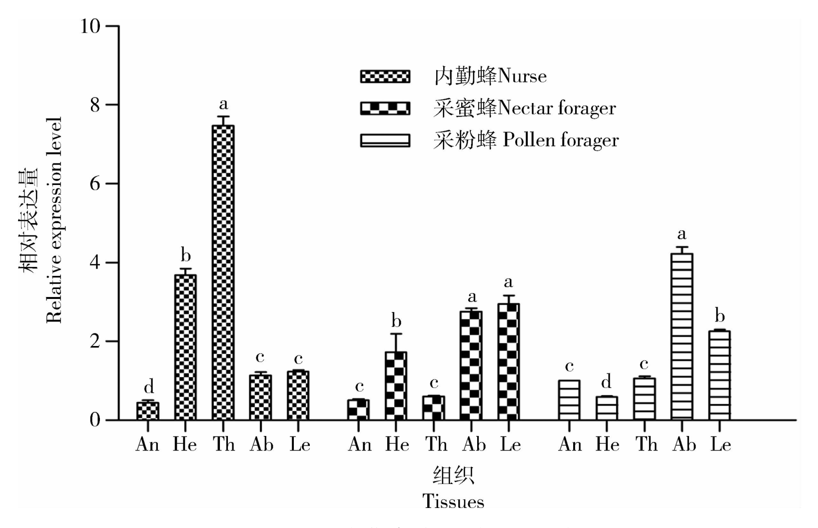


图 9 *Acmvl* 在中华蜜蜂不同组织的表达量

Fig. 9 Expression level of *Acmvl* in different tissues of *Apis cerana cerana* workers

An: 触角 Antenna; He: 头 Head; Th: 胸(带翅) Thorax (with wings); Ab: 腹 Abdomen; Le: 足 Leg. 图中数据为平均值 ± 标准误;柱上不同的小写字母表示同一工蜂亚型不同组织间差异显著($P<0.05$,单因素方差分析)。Data were mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (One-way ANOVA variance analysis) between different tissues of the same worker subcaste.

著,最低为触角中(0.444);采蜜蜂中,腹部表达量(2.956)和足部表达量(2.759)最高,与其他部位组织差异显著($P<0.05$),头部(1.607)次之,触角表达量(0.512)和胸部表达量(0.607)最低,且二者间

差异不显著；采粉蜂中，腹部表达量(4.225)最高，显著高于其他组织，足部(2.266)次之，再次是胸部(1.061)和触角(1.000)，且二者间差异不显著，头部表达量(0.593)最低。

3　讨论

3.1　关于中华蜜蜂 Acmvl 氨基酸序列的同源性分析

本研究首次克隆了中华蜜蜂 *Acmvl* cDNA 序列，其 cDNA 全长为 2 130 bp，编码 1 个由 587 个氨基酸组成的跨膜蛋白。基于氨基酸序列构建的系统发育树结果显示，Acmvl 除与膜翅目昆虫的 Malvolio 聚为一较大分支外，与哺乳类动物中人和小鼠的 Nramp2 聚为另一大分支，且氨基酸序列一致性分别为 63% 和 64%，这表明 Acmvl 与 Nramp2 可能为同一类基因编码的蛋白。

将 Acmvl 与小鼠、植物、黑腹果蝇和酵母 Nramp 家族氨基酸进行同源性比对，发现 Acmvl 与它们在跨膜区、跨膜区带电残基、糖基化位点和转运蛋白特征结构域上存在高度保守性，符合 Nramp 蛋白家族特征，属于 Nramp 蛋白家族，其中与小鼠的 Nramp2 相似性最高，推测 *Acmvl* 可能为 *Nramp*2 的同源基因。Acmvl 与 Nramp 家族同源体间结构上的高度相似性说明，它与 Nramp 家族蛋白可能具有相同或相似的金属离子转运功能(Cellier *et al.*, 1995)。

3.2　中华蜜蜂 *Acmvl* 的组织表达差异性

*Nramp*2 广泛表达于各组织和细胞内，具有宽范围的离子转运功能，可以转运 Cu^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 等二价金属离子(Supek *et al.*, 1996, 1997; Liu *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Nevo and Nelson, 2004)。哺乳动物中，*Nramp*2 主要表达于小肠和十二指肠上皮细胞的绒毛膜刷状缘处，是介导肠腔内 Fe^{2+} 转入肠细胞的唯一转运体(Gunshin *et al.*, 1997)。果蝇中脑、马氏管、性腺、胚胎羊浆膜及幼虫和成虫的消化道也检测到 *Malvolio* 基因的表达，其中在中肠前端和后端肠细胞内的的表达可能与 Fe^{2+} 离子的吸收转运相关(Folwell *et al.*, 2006)。Bettedi 等(2011)通过金属含量测定实验，发现 *Malvolio* 基因主要影响果蝇体内铁平衡，且果蝇体内的多铜氧化酶 MCO_3 可能具有类似哺乳动物亚铁氧化酶的功能，即能够将肠细胞吸收的外源性 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+}，排放到血液循环系统供给全身各处。这提示 *Acmvl* 在内勤蜂、采蜜蜂和采粉蜂腹部的表达差异可能与腹部肠细胞转运 Mn^{2+}, Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 有关，尤其是 Fe^{2+}。

基于 *Nramp*2 在体内广泛分布，且可以转运多种二价金属离子，*Acmvl* 在不同组织可能行使不同的功能。王海涛等(2009)发现游泳训练组大鼠通过上调腓肠肌细胞膜上 DMT1(属于 Nramp 蛋白家族，又称为 Nramp2)和 TfR1(转铁蛋白受体)，进而向肌细胞内转运更多 Fe^{2+} 来满足运动的需求。这表明 *Nramp*2 可以通过转运 Fe^{2+} 参与了肌肉运动，而蜜蜂的胸部和足部含有大量肌肉组织，所以 *Acmvl* 高表达于内勤蜂胸部和采集蜂足部也可能与转运 Fe^{2+} 参与肌肉运动有关。

Ben-Shahar 等(2004)采用原位杂交技术检测到 *Ammvl* 基因表达于西方蜜蜂脑部的蕈形体、触角叶和食管下神经节。蜜蜂的采集过程也是一个对喜欢或厌恶的条件刺激进行学习记忆的过程，糖对蜜蜂来说是一种奖励刺激，而盐是蜜蜂不喜欢的一种刺激，而多巴胺和章鱼胺在蜜蜂和果蝇奖励或惩罚的学习记忆中扮演着重要的角色(Schwaerzel *et al.*, 2003)。而大部分多巴胺能神经元受脑中蕈形体、食管下神经节和前脑支配(Selcho *et al.*, 2009)，章鱼胺在触角叶中的功能也可能与蜜蜂的采集行为相关(Schulz and Robinson, 1999)。加之，早有 Mn^{2+}, Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 影响果蝇味觉识别的报道(Orgad *et al.*, 1998; Southon *et al.*, 2008)。因此，*Acmvl* 在头部的功能可能是通过转运 Mn^{2+}, Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 参与多巴胺及章鱼胺通路来影响蜜蜂蔗糖反应进而影响其采集行为的。

本研究中 *Acmvl* 在头部表达量为：内勤蜂最高，采粉蜂最低，采蜜蜂居中。这与 Ben-Shahar 等(2004)在西方蜜蜂头部表达量内勤蜂最低，采粉蜂最高，采蜜蜂居中的结果不一致。这可能与蜂种及采样群当时所处的巢内外环境有关。Ben-Shahar 等(2004)所取的采蜜蜂和采粉蜂均大于 3 周龄，而本研究是根据行为特征而随机取的采蜜蜂和采粉蜂，未考虑其日龄因素，样品中可能包含有提早采集和过老的采集蜂。而另一个与采集行为相关的 *For* 基因在西方蜜蜂头部表达量为 18 – 22 日龄达到最高，早于或晚于该日龄段，表达量均会降低(Heylen *et al.*, 2008)。这提示 *Mvl* 与 *For* 同样作为与果蝇觅食相关的基因，其对采集行为的影响也可能随日龄变化，在早熟和过老的采集蜂头部表达量较低。刘芳(2012)对意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂头部 mRNA 高通量测序的结果显示，*For* 基因表达量在

哺育蜂头部高于采集蜂，且差异不显著。因此采集行为除受 *Acmvl* 调控外，还会受到蜂群结构及外界蜜粉源环境等因素的影响。所以有关 *Acmvl* 对中华蜜蜂采集行为的影响还有待进一步研究。

参考文献（References）

Ben-Shahar Y, Dudek NL, Robinson GE, 2004. Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter *malvolio* in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.*, 207(19): 3281–3288.

Ben-Shahar Y, Leung HT, Pak WL, Sokolowski MB, Robinson GE, 2002a. cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the foraging gene in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.*, 206(14): 2507–2515.

Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski MB, Robinson GE, 2002b. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science*, 296(5568): 741–744.

Bettedi L, Aslam MF, Szular J, Mandilaras K, Missirlis F, 2011. Iron depletion in the intestines of *Malvolio* mutant flies does not occur in the absence of a multicopper oxidase. *J. Exp. Biol.*, 214(6): 971–978.

Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P, 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(22): 10089–10093.

Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N, Hediger MA, 1999. Yeast SMF1 mediates H^+-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.*, 274(49): 35089–35094.

Folwell JL, Barton CH, Shepherd D, 2006. Immunolocalisation of the *D. melanogaster Nramp* homologue *Malvolio* to gut and Malpighian tubules provides evidence that *Malvolio* and *Nramp*2 are orthologous. *J. Exp. Biol.*, 209(10): 1988–1995.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA, 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641): 482–488.

Heylen K, Gobin B, Billen J, Hu TT, Arckens L, Huybrechts R, 2008. *Amfor* expression in the honeybee brain: a trigger mechanism for nurse-forager transition. *J. Insect Physiol.*, 54(10): 1400–1403.

Lindauer M, 1953. Division of labour in the honeybee colony. *Bee World*, 34: 63–73, 85–90.

Liu F, 2012. Integrating of Solexa High-Abundance mRNAs and miRNAs in *Apis mellifera*: Comparison between Nurses and Foragers to Identify Regulatory Network. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou.［刘芳，2012. 意蜂哺育蜂与采集蜂头部 mRNAs 与 miRNAs 表达谱 Solexa 测序比较分析及其调控网络研究. 杭州：浙江大学博士学位论文］

Liu XF, Supek F, Nelson N, Culotta VC, 1997. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD_2 gene. *J. Biol. Chem.*, 272(18): 11763–11769.

Nevo Y, Nelson N, 2004. The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1. *J. Biol. Chem.*, 279(51): 53056–53061.

Orgad S, Nelson H, Segal D, Nelson N, 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J. Exp. Biol.*, 201(1): 115–120.

Page REJr, Erber J, Fondrk MK, 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A*, 182(4): 489–500.

Pankiw T, Page REJr, 1999. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A*, 185(2): 207–213.

Robinson GE, 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.*, 37(1): 637–665.

Robinson GE, 2002. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *American Naturalist*, 160(S6): S160–S172.

Schulz DJ, Robinson GE, 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol. A*, 184(5): 481–488.

Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M, 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 23(33): 10495–10502.

Selcho M, Pauls D, Han KA, Stocker RF, Thum AS, 2009. The role of dopamine in *Drosophila* larval classical olfactory conditioning. *PLoS ONE*, 4(6): e5897.

Southon A, Farlow A, Norgate M, Burke R, Camakaris J, 2008. Malvolio is a copper transporter in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 211(5): 709–716.

Supek F, Supekova L, Nelson H. Nelson N, 1997. Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *J. Exp. Biol.*, 200(2): 321–330.

Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N, 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(10): 5105–5110.

Wang HT, Liu YQ, Liu JG, Duan XL, Zhao HB, Yu P, 2009. Progress in the study of iron metabolism of skeletal muscle cells. *Journal of Physical Education*, 16(3): 96–100.［王海涛，刘玉倩，刘建国，段相林，赵焕彬，于鹏，2009. 骨骼肌细胞铁代谢的研究进展. 体育学刊，16(3): 96–100］

Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE, 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, 302(5643): 296–299.

Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401–406.［杨冠煌，2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报，48(3): 401–406］

（责任编辑：袁德成）